## Novel antibodies and methods for their use.

Publication number: JP6506827 (T) Publication date: 1994-08-04

Inventor(s): Applicant(s): Classification:

- international:

A61K39/395; A61K47/48; C07K16/46; C12M1/34; C12N5/10;

C12N15/02; C12P21/08; G01N33/536; G01N33/542; G01N33/543; C12R1/91; A61K39/395; A61K47/48; C07K16/46; C12M1/34; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/536; G01N33/543; (IPC1-7): C12P21/08; A61K39/395; A61K47/48; C12M1/34; C12N5/20; C12N15/06; G01N33/536; C12N5/20; C12N15/06; G01N33/536; C12N5/20;

C12R1/91

- European:

A61K47/48T4B46D; C07K16/46D; G01N33/542; G01N33/543B

Application number: JP19920508633T 19920424

Priority number(s): GB19910008954 19910426; GB19920007192 19920401;

WO1992GB00769 19920424

Abstract not available for JP 6506827 (T) Abstract of corresponding document: EP 0511011 (A1)

This invention relates to antibodies and is particularly, though not exclusively, concerned with diagnostic and therapeutic methods using monoclonal, bi-or tri-specific antibodies. The invention also provides a method in which binding of a first antigen to a first antibody antigen binding site cause release of a second antigen from an adjacent second antibody antigen binding site.

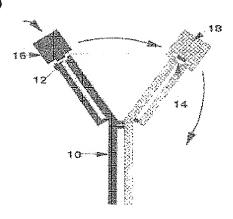


Figure 1

Also published as:

JP3431140 (B2)

EP0511011 (A1)

EP0511011 (B1)

US5573920 (A)

NZ242510 (A)

more >>

Data supplied from the esp@cenet database --- Worldwide

## (19)日本顕特許庁 (JP)

# (12) 公表特許公報(A)

## (11)特許出願公表發号

# 特表平6-506827

## 第1部四第1区分

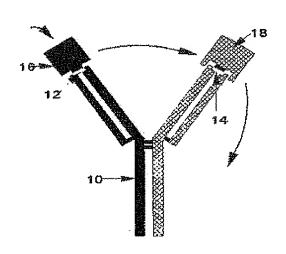
(43)公安日 平成8年(1994)8月4日

(51) Int.CL.* C 1 2 P 21/08 A 6 1 K 39/393 47/48	線別館号 M Z		F (	hr. 7 ( 00	
		8412-4B 9050-4B	CIZ	N 5/00 15/00	B C
		審查抽求	未請求 予	備審查請求 有	(全 16 頁) 最終買に続く
(21)出爾賽号	<b>排版平4-508633</b>		(71)治原	【人 サーフィス	・アクティブ・リミテッド
(86) (22)出額日	平成4年(1992)4月	24日	j	イギリス圏	、エイボン、プリストル、ハー
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)10月	26 🖹		ペリー・ロ	一ド、ヘンリーズ・ハウス、赤
(86)国際出職番号	PCT/GB92/	700769		ウトン・ス	トーン(番地なし)
(87) 國際公開番号	WO92/1997	3	(72) 魔蚜	i巻 ランドル、·	ベヴァリー・ジェーン
(87) 樹聯公開日	平成4年(1992)11月	12日			、ピーエス8・2エックスエ
(31)優先權主頭番号	9108954.0	ı			ン、プリストル、アッパー・ベ
(32)優先日	1991年4月26日			ルグレイブ	- ロード 19
(33)優先檢主照阻	イギリス(GB)	•	(74)代理	人 弁選士 會	親 道縣 (外6名)
(31)優先權主張器号	9207192.7	•			
(32) 銀先日	1992年4月1日		•		
(33) 優先情主機關	イギリス (GB)		And Andread Processing Control of the Control of th	* ***	
			War Brinding and American		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 仮体およびその使用方法

## (57)【要約】

本発明は抗体に関するものであり、かつぎ細には、これに制度されるものではないが、モノクロナール抗体、2 特異的抗体または 8 特異的抗体を使用した診断用および治療用の方法に関する。また、本発明は、第1の抗爆の第一抗体抗原結合部位への結合が隣接する第二抗体抗原結合部位からの第2の抗尿の放出を引き起こす方法も提供する。



#### 陳 京 夕 配 斑

- E 第1の放展の第一依保設策略会解析への総会が開催する第二技術范原標 合部並からの第2の抗菌の放出を引き棘ごす、精浄からの貧罪放出方律。
- 2. 新記集一封よび第二統体抗原総合都億が同一の機能により振復される。 対象塔もは記載の方法。
- う。 制能放休が2特異的拡张、3特異的拡張はたは他の多特異的対象である。 建設期2に製造の方法。
- 4. 初記券一および第二核集就原統合都並がそれぞれ第1日よび第2の統件 により提供される、韓文項1に監載の方法。
- 5、 産業的主众は試験審例で実施される契斯機、結果用されは英華用の方法 である。耐充収を一4のいずれかひとつに記載の方法。
- 6. 前結第2の長原が研究はたは他の徴じ可能なマーカーである。諸家頃5 た記載の診断剤の方法。
- ア、 有霜第2の寝原が能療作用蒸てある、錦衣権5は窮餓の他様方法。
- 8. 新記第一日上び第二次作記京橋会旅位が、20 He/el を建える変由法 例で装置に結合された。1つの指揮または無1および第2の前体により協議され る、熱思遠ちに延載の方法。
- 9、 関都統体が50~100 元がの の蛋白清度で表面に結婚されている。 許学項号に記載の万名。
- 10. 前額表面がマイクロタイタートシーのウエルの表面である。請求項を またはりに記載の方法。
- 11. 暫記数2の底層が終二級本法服部位に不適性な過度で認力しているか または放蘇症に始合することにより不活地となり、かつ男士の贫寒の第一院休徒 原籍合都登入の地合の使に活体な形萃で拡張される、基本項1~10のいずれか ひとつに抱動の方法。
- 一方の選利制解体が存むするときに活性となる選解的解除である。就成項1~1 7に記載の治療用の含含。
- 19. 第1および第2の酵素がそれぞれ第一切よび第二粒漿時会解放から治 性な形態で放出されるが、このとは、これら2つの放出される除標は失にもう~ 方の開業の存在でで反芻を熱震するものである。雑葉張り~18に発起の格頭馬 の方法。
- 20. 抗原含よび酵類に対する組合器位を表し、菜種類の抗体への報告は菜 韓紫を不発性とする多智護的鎮津と試製とも暴駄させ、その物前配収度の装填件 への結合が縁紅なからの朝廷斡旋の感性な形態での故患をもたらすこと。ならび に延知中の前組収収の存在と示す資訊数出される厳禁の結婚を推奨することを含 む、城城中の前記領環の存在または不非在を撤定するための免疫線定方法。
- 21. 貧氧抗症が2時期的抗体である。構造限20位配輪の方法。
- 5.4 に脱蛙の方路。
- 23、 報話性展示能映圖活性物質ア本語自然である、調楽場20~32のい ずれかびとつに記載の方法。
- 24、 細胞線熱が、3・ボラクトレダーゼ、グルコースカモシゲーゼ、カレ ナーゼ、異敵級水鉄路差、立たはホースラディッシュベルオキシダーゼである。 対応導20~23のいずれかひとつに花転の方法。
- 25、 科外が収集への積合により不消性ときた、そして抗量の気体への減合 の際に活性な形態で放出される。彼風および啓蟄に対する総合部位を安するを作 怒的抗体。
- 26、 財配必然其的抗体が3特異的抗体である、請求項25に記憶の多辨英 的旗件。
- 27. 防災原活性物質量自入および静実に対する結合計道室等し、基礎業の 抗体への後令が誤職禁亡卒活性とする多時期的抗体と誘拐とを接触させ、その原 原表的活性特別蛋白人の製物体への酵素が蒸気体からの用型酵素の活性な影響で の数論でもれらずごと、ならびに試料中の筋砕顕褐液物質聚合Aの存在を希中菲 記食品される酵母の素種を収益することで含む、個乳動物が残試料中の診療競派 性物質資密人を検出する方法。

- 12. 南紀第2の社類が嘉麗さた仏像の治療作用場。飛帯または近親居作局 東である、諸京漢11に駐戦の方徳。
- 13. 新記第2の抗菌の第二抗原基合師紅からの放送に引き続き、誠然患や れた第2の抗傷または健康なの抗聚の反応生成物の東王抗原統合都近への避合が 起こり、それにより、翻弦する集階級保護團組合部並からの報路値に結合してい た第3の抗頭の放出を引き起こす、減水項1~12に配数の方法。
- 14. 歌新翔マーカーおよび練業または他の検担可能な診断度インジケータ にそれぞれ対する第一および第三位原始を終位を変し、抗体への総合が非定計器 または他の検は可能なマーカーを不活性にする事!の抜作、契幹需率だは他の核 出国際なマーカーあるいは鼓降落立たは他の後出可能なマーカーの変形出式株。 あるいはそれらにより種類される変形の反応生成物に対する第一部間接合部のよ 深刻まれは他の治療作用医院対する第二流療施会部位を案する第2の技术をそれ ぞれ合み、類記案よの転体に対する構筑節間用マーカーの総合が、結准な形態で の前至結合した酵素をたほ他の核心可能な動脈器マーカーの放出を引き発こし、 そして、取酵素または他の検送可能な診断層マーカーが短報茶をの航時に組合し て、結合した業期または他の治療作用風の鉄第2の航床からの夜出を引き届こす。 推索項よらに網難の方法に独用するなめのキャト。
- 15. 絶滅雨マーカーに方向付けられた第一拡高結合総位、インジケータ駐 常に実術的けられた第二は原語合語位、コよび不満是な形象で辿られる結合した 菜前またほ池の治療作用薬を寄する天里放取結合物能を含む、糖菜項130万法 に鉄尿するための3発器的抗体。
- 16. 供給者なは監察場を示すマーカーである第1の表現に万珂作けられな 第一批製法合修道を与びに運制または他の治療作用業に方向分行られた復生抗原 は合新色を寄む、正常上の抗原の第一抗原籍な都違いの結合が第二括合都並から の耐能衝撃作爲異の故母を引き落こす。多特異的精弊。
- 17. 前記勘測また日母の治療作用窓が不溶型な形態で的影響に抗災線会所 **位に結合するか務別はに結合することで不活性な必然となる。精和項13~16** のいずんかびとつに記憶のキットまたは歩行義的資料。
- 18、 1つの抗菌結合部位から国刑非軽症が放射され、そして別の鬱迫から は別の展別的駆除が製出されるが、よのとき、よれらの異何前駆除は互いにもう
  - 28. 前型抗体が立物等的抗体である。請求模なでに結成の方法。
  - 39. 有記録素が月・ガラクトレダーゼである、雑菜様28に結構の方像。
- 30. 8户・人および開催に対する結合部位を有し、預期者の妨伤への眩を が弦響機を不遜也とし、SP・Aの銃体への総合が銃体からの類似酵業の活性を 必然での故俗をもたらす。 請求項27~29のいずれかひとつに知識の方法に供 用するための単純質的技体。
- 51. 敦尼流体が、ブグベスト係的の契約指導に築い、突襲、ボートングウ ンの適州関物経路接受コレクションに電影撃号 92042711 として高起なれている **胡稚菜GAL30,39により生産される従ぬである、請求項2?~39のいず** れかひとつは記載の方弦集を指記庫。
- 3.2。 第一および第三数国際会部位を増える前に収集がバイオセンサの最初 と描きされる、観象棋1~32の51ずれかひとつに記載の設断局の方法または先 症特定方法に逆額するためのバイオセンす。
- 33. 就政項36または17は認故の多勢勢的統律ならびに孫原体に執分し た郷剤はたは他の治療性膵臓を含むキット。
- 54. デダベスト重称の契約素項は低い、及重、ボートンダウンの限用額的 細胞均铼コシクションに反射接号 820678:1 として寄託されている領国系ロ人し 30.19.

## 特袋平6~506827(3)

#### 9 # B

#### 放水紛上びその使用資料

本発明は就体に動するものであり、かつ群都には、これに制製されるものではないが、モノクローキル技体、ある inth 2 発昇的 (bisocsific) または 3 改選的 (trisocoific) 等の多効異的 (potypocsific) 就体を依用した診断場がよび治療の方法に確する。

をフクローナル技術に基づく状体験定は、一級的には研究繋において訓練された 法律等により実施されなければならないため、その物性能力を完全には残死していない。 比較的解棄な独足できる、洗浄工程と引作業による数多い配列の総加 を必要とする。広い分野に連絡し係る1工程のシステムが必要とされている。

モノクローナル程序はまた、疾患の治療においても開端が見いだされている。 例えば、体内の維持を確認もよび治療するために、強知蛋白に対理された。リンションは財産疾跡を包含する、連続物質で資産を改議するモノタローナル抗体 な会体が確認されている。

マノクローナル液体技術によりで特別的気体が開発されつつあり、2時期的免費グロブリンCの割では、各々の2特異的技体が特別途の異なる2つの技術結合 割値を容している。2時間的対体は、それぞれ目的地(interest)模様に行する モノクローナル技術を分出する2つの表するハイブリドーマを放金して、(単位 ":Kリドーマ (polydons)" を称される。11 つの推構のイブリドーマスでは"ヒューアーマ (Jesons)" を形成することにより製造される6. [Songairs] に、8 cod ショウの (Jesons) を形成することにより製造される (Songairs] に、8 cod とnebasas F.J. (2890) でin Say [wound] た。815 cod Sured 版 は 社 (1985) Pros. Natl Acad Sci 876 83、7968 and G B 210921は、熱ハイブリドーマは減 後代の下級拡充大統組裁可能や影響をの訴入により取り降くことができる [De Lau 3.H. at pl (1988) J. [monact Netbook 127.8]. 我们に関係された2件具

よび3特異的統件器の、1つより多い技算符合部位を書きる抗禁金でを含する。 第一部は人の適の分子の結合を介する第二部位からの紹介分子の原出は、抗体的 介容や影響深入(anathody-redisted signal transduction)と気件することが できる。本文中で聞いられる「抗性"という結構で、1を6、「8A、18M、 1をD出よび18色等の免疫プロブリン、ならびに関禁に全じる対策立では環境 えりれる技術はた後その部の機関の方法全てにより製造される完長の健康物合特 造を有する他の器負責を包含する。

本発明をもは、非常に高い強度、疾患的な調度が必要的には1~5 mb/n であるのに対し、耐力は10~1,00 mb/n よりも高い機関でマイクロタイタートレー [sierotitise tray) 上に比重がプレーティングされると、ある前体に原始を必要に指揮がつる三流体性疾患を結婚に対象した他の抗原の変由を引き落こした。ほど降終する其原語を再しまかって、発生して脱匿されるという、強くへき相見を終た。好ましい最適感数に対象に対象に対象に対象し、行きしくは的50 mb/nt よりも高い優出質機関で示義機関に対象を含ませることを含む。

業2の情景は第二位体質原始合命位に不错像な必然で数かされ、そして第1の 抗反が第一段体質機能を創造へ結合する際に活性な解説では患されることができ あ、第2の環境は、深刻さたはその他の治療関係用層、体集まなは他の発出可能 なマーカー、善るいは化粧用作用器であることができる。この健構は、別えば、 ターガラクトンケーゼスなはウレアーゼであることができる。

セノタローチル抗体は無油磁路割の体界をプロックすると経費を打ている。例 えば、抗体状の一) は強い抗病抑制であるマイトサントロン(mitagentrose) の報 総等消制を中期する [Flaveil 50, Flavell Dif(1901) か.J. Macrotol. 22, 8%の 3)、本見明による、策制にお向待けられた結合形位をもつ値え、その裏剤を不活 性にする2特異性抗体は、この2特異性抗性の美工抗原結合部位が方時付けられ ている分子の乳環度症に対いて発性が誤算を放出する。

第二級政場合派位からの状態の政策は、設定された依原、高えば、従業されは 割の経験分平の、あるい場存在するならばその反応生成物の1つ、研えば、政策 された対策により対対された反応の反応生成物の、環境する基本上の展示事故に おける協会を誘導することができ、それにより、保険する基因性原籍を測定から の承三の場合状態の数比を引き扱いすことができる。 的版体は機関の免疫接受に用いられた《Milatein C., and Goolle & C., (1983) Mature 200 597]。この資本は、モノクローツル接往を升途する認識と免疫マウスからの誘環機器とを融合することにより要認された。第一結合認識は知的物程
原化物質的であった。酵素の起金部位である第二結合関連はマーカー酵素に移棄 対であった。無限に対われた免疫機関は、検定環境、便可に対するノイズの変か、 検色処理の環境化、および軽性構造相部の保証を増加支付な。

 Z台葉的抗体は、妖気との結合を拡持する、腫瘍に対する効果酸トキシンを用限とする {Corvelen JRF 性 社 (1997) Censer Season | 3 Monother 20 1887]。 あるいは採防害性キラー 総称上の頻整抗原と傾的性素とを交叉連絡させる{Nitta J., 性 社 (1980) Leason 325 863 and Fender 附 and Cuyre おり、Tibleck を 955-980 (1981) 等の前頭を含物疾方式において広範を用途が見いだされている。今後表的は大は3種異的対象の、化学的リンケージ等のその私の製造は、保着の 蒸気において根据されている。

90 90/0771 4 明顯養は、ある酵素が支持薬的抗体を持合することにより、熱変能に対して安度をされる免疫構立を採示している。

WC 91/09134 明線審は、不確任な就無的前隔途をその過性な影形に 変数する計構とは下窓周囲の展界と結合し得る2有異的変体を開発している。こ の抵抗と健治と含含む変複合はは、不断性を取納和解除と共に電影響のほうを な、差小程の副作用で感情態を迅気制に続きことができる。この静勢は価値な疑 夢を建存して抗休に行会している。また、ボリギーマの製造が減り商示されてい

本発明の目的のよつは、脱来の免疫協定法よりも反応工権数の少ない。好まし くはよ工程のみを含む免疫核定法と関係することである。

本集階の1つの態様によれば、ある抗療が1つの概率抗疾治自荐原に結合することが、開指する第二抗体抗原料合配能からの則の技術の夢思を引き結ず方法が提供される。 単格による操作性と望むものではないが、所たな抗療と初めしていた抗康との間の立体体をが、結合していた抗康の第二統体抗療治療部能からの拡出を引き起こすのであると本連明者の抗療指している。所であるど本主法抗抗病治療的に対抗している。所であるど本主法抗抗病治療的に対抗している。所であるが基金が指針、同一の赤程療的(malcaspedified)資料また核和眼的に解接する対の技術により減失されることができる。"予格義的"というが結構、影響が対

整備用を物質的状体は、第2の"過程"連本特異的技体における胎体用を用定の並出を調解することができるが、それは、診断用インシケークの作1の抗体の法・結論部段への試合が原1の抗体の法・結論部段へのはなか原1の抗体の法ともたらし、この法国された原語またほその反应生命制の1つが第2の抗体に協会とし、そして次は、この二番目の結合事故(event)が第2の対体に協会されていた法法原作和項の成法を引き起こす。カスケード和原による。詳細の関心を成功的結合は、が細語合信号の場場を並むので、詳ましいことである。やはファケード作用により作動する計画が過程的3種類的技術では、第一技術的治療が動間局で一分一に方向対方が、無一技術が一分では、第一技術的場合は、そして第三技術的表情でかられ、第二技術が一般では、新年技術的表情を表現的方法を表現的方法を表現の表情を表現的方式と対する。立体をその用途に適当するようと表えることが可能であることとは対解されます。例えば、10の異なる反応工程を特徴とする15 所述法が使用され得る。

新ましい実態結構においては、ある良原語台割位が、熟葉群等の活性部位また は知識開選別の作用にとって本質的な分子成分等のインジケータ/台灣の活性部 最高もいはその延停に見ける分子高台により、不活性を形態で計解用または治理 間の作用度を保持する。急襲方性において、英二規原法合部組は、乗急または故 生性等とディマーカー等の試験対象分争に対して方向付けられる。このマーカー の存住でに、平倍性なが建せの得ちれた作用策が、2つの異なら政体は原始台 のの非常を近接による互体軽等の結構として、透性な形態で立めは休息原始台 度においては、結合された不過信を作用系が、財産の試験対象の試験用分子また は印の気度、あるい以常態が実施されている指揮、サイル以または他の原係物に 組むれた分子または他の拡展の存在により放出まれることができる。

本義明の抗体の診断期の使用は、昔らに以下のことを包含する。

株水、短短の吸引線、消化室の吸引線、直域、距域切片やのSP・Aの基準。 SP・Aの不存在また仕場いレベルがリスクを要す、呼吸函数線装器(RDS) のリスクの影響。

RDS原児および成人RDSの成人素者における塑造風の状況の監視。SP・ Aの増加したレベルが正常な動造能を成す。

人工表面感性的复数核治療の智能の監視。報復期の状況の微便はSP-Aの状況により計量相付もなる。

異なる競技からの2つの異なる場合分子の放出は、双方の放出分子が存在する とも行のみ描さる反応を経ふすことができる。反応生成後は、監算の数据を研究 する別の気体と様をすることができるが、絵楽葉とは、嵌えば、その損体に結合 した始集席または参照用分子等である。治集馬迪において、西方の英語前類なが 存在するときに治性薬剤形態をとり、そのときにのみ治球のために活性となる2 つの項羽動射針が散出されることができる。例えば韓森の始節において、第1の 2分異的記念は、多くの非理解のインジケータであるが終確認識機関アが要白A (\*SP、A\*) に対して方向付けられた第一款策略合都位。および東邦前配件A に対して方面が行われた第二枚原稿合部位を有する。第2の2份供的抗療は、急 建な単純生長のインジケータであるトランスフェリン党容体に対して方向行行が れた第一抗原粘合部位、および運動解除は、影や撮影複雑体目に対して方向行け られた第二条位を有しているが、選解期限年入と3は前令して活性な試施課金体 となる。結合を改立前列前離体AとBを育する2つの技術を含むカクデルを辞標 型者の治療に使用すれば、SP·Aとトランスフェリン発容体の存在でに薬剤器 動体人と言言性出して抵性な抗癌媒合体も形成させることが可能であるう。如脈 用途においては、2つの異なる診断層技能の存在がカスケード熱学技能を誘発し、 深方の診断用エピトーフが核出されると、線出可数な診器用インジケータ連動だ **計が生成される。前えば、インヒビンの方無と8頭それぞれに特異的な第一抗菌** 結合係位、およびボースラディッシュベルオキシグーゼとグルコースオキシダー せそれぞれに特質的な第二統統諸権が位を寄する2つの言語異的統律が使用され ることができる。インセセンの大幅を自動の存在学に、グラコースはグルコース。 オキシダーゼにより変換されて過数化物を出端し、次にこの過酸化物は、オルト ウェニルジアミンの福島に横黒町雑な菇質変換と関時に、ベルオキシダーゼによ り製造される。所住結果が得られる場に2つの異なる技楽部位が報出されればな ら次い従来の抗療機関核境と飼ぶく、関佐結果が得られる。

第一的よび類立院原語会議位は、(i) 免疫検定において容器表面をユーティングするための、共に20 mg/ml、済をしくは50 mg/ml を相える高速度の2種型のモノクローナル気体の高分型。(ii) 2特異的解除に加えて、親モノクローナル抗体を分泌するセューソーマ、および(iii) 策なる領域に対する符合部位を有し、均質に結関されるか、またほどが的維難により出域それた2特別的抗能

により、概要さればる。初記事故(1) は無趣問題資料入であると考えられ、時時に前転(ii) は細胞内型質様入であると考えられる。時間事故(ii) は細胞 簡素上が細胞内の影響様入を含んでいる。

か然期の今干価属干発信は、2種類の予め存在するモノクローナル流体の混合 減、または果味製2効果的病体の事業的な処理、再えば、重用人または量点の含 関いたサフェニティクロマトグラフィーあるいはイオン交換とたほグルデ急によ 含分泌された免疫グロブリンを分離するための処理により、延行的に達成され係。

分平内状体は今発信には、均質に移動された2特異的または3符異的失変グロ ブリンを必要とする。物質とする場の構製は、それぞれの核質部位がそれに対し て方向行行られた規制機でとリックスを用いた、シーケンシャルデフィニティク ロマトグラフィー工程により認成されることができる。だって、手行葉的抗体は、 不動化した酵素。 始ま用表現までは均断用分子を使用したクロマトグラフィーま た任イナン支援により構製される。

要用効果の具対なアフィニティクロマトグラフィーは、均度にする知の雑穀中に不動化軟体が必特券的記述のイディオタイプ就原決定法を保険する。不動化した技术ディオタイプ就原でよったで運成される。

本権動の市の基準によれば、結構中における抗型の存在または不存在で別定するための免疫検定方法が提供されるが、その方法は、抗菌力よび除薬に対する筋合能にをおし、技師機の技体への指数が技術業を不活性にする多物契約並至と登録させ、その密制配抗原の総抗体への指金が関合していた育配酵素の通过を発酵での原放はからの変化でもたらずこと、ならびに試費中の協抗薬の存在を余字点所もれた循係維用の超速を決定することを含む、輝ら、本見明のこの思数は1支配工程を含む機構を受象検定方法を提供する。

層信による無利りを望むものではないが、本見明常らは、何たは結合した政策 と前合していた辞歌との間の立体降者が、技体からの軽蔑の批出を引き疑定すと 確信している。従って、耐無は、目的物態原との立体験者を効果するように、典 題的にはそのサイズに差づいて延安とれる。使用される抗体は、死分に変異なほ 立て軽禁と結合して、解析が就取の不存までに連合を終くことがないようにする べきである。無知は、その情性が近で弦伝と結合することが遅ましい。

同文は、その欠之が早在の未無境に起こる四重圏建立医腎のリスクのインジケータとなるSP・人 [Actions state (1988) An J Obs Groccol (258, 1533 かは) 医であってもよい。この呼吸状態は全領生況の2%を習む、そして生生で連続日内の建密制度の変にの表も一級的な原因である。

酵素は、例えば、金工の排鉄が充分に特別付けられ、かつ容易に積速可能な融 際である、月・ヨラウトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、旋酸 駅水鉄料料またはホースラギィッシュベルオカシダーゼであることができる。

本発明の総の限点によれば、軽素が技術への超会により不適性となり、そして 技術の技能体への対会の際に活想な形態で詳談なから取出される。近期と酵像に 対する動物無値を有する多額異例拡体が要使される。この拡体は2特殊的経緯で あることが再立しい。

本集明の他の基礎によれば、SP・A および開業に対する結合関係を有し、無 解析の前はへの結合は排棄を不銹性にするを特異的試像と試算とを保護させ、そ の限SP・A の抵抗さへの結合が結合していた商素の絶性な消息での認該体から の效出をもならずこと、ならびに試核中のSP・A の存在を示す效法された個性 経費の存在を検出することを含む、値軌動物等機は利中のSP・A の検出方法が 送銭される。この酵素は、3-ガラクトシグーゼであることができる。

本規則の他の極端によれば、就能力上び第1の確素に対する行合的値を有し、 提案1の翻算の反应生成物が執わ中の抗策の寄在主要する場に核密可能な反応を 数媒介を(第2の前項の)第二部値の第2の語表の高度として作用する、第1の 2時間的試験に試験を実験させることを含む、試制中の抗原の等在または不事権 を設定するための免費限定方をが接続される。制記第1の課券はダルコースオチ レゲーゼであることができる。また、初記第1の課券はダルコースオイ サゲーゼであることができる。また、初記第2の課業はホースラディッシェベル オキシダーゼであることができる。

本花場による絵館方法はどれた。手葉異的前能がパイネセンサの生物学的歌葉 製業(tenning elects)として他くパイオセンサーにおいて実施されるために 予め事偶されることができる。現它までに、サノクローナル記録を質値パイオセンサに対いて、ヒトゴナドトロピン(foblisses G.A. 弘 社 (1287) Rissensers 3, 147) および大品中のスタフィロコッカス・アウシウス(<u>Steintersattes</u> turgen)[Kirhabilolishi E. 弘 社 (1980) 5, Apri. Bacteriol <u>68</u>, 577] が核 朗されている。しかし、彼古昭紀体は抗体体合領原の調度的に集等によって取換されてしまうに当がいないことおよび解集の商生にも同様があることから、一般 明波用は不可能であると経明を代でいる。本発明の方達は内症性神気(integral alleree)を使用するので、2 辞真的試験は理像および平原確定性核性性環境は正確環境 スタ(1 SFET)はグルコースオキシダーでを特金した2 発展的関係を含むことができる。何とは、原準に優別できたことができる。何とは、原準に経過であれたはイガン即等性電影が展り下シンジスク(1 SFET)はグルコースオキシダーでを持金した2 発展的関係を含むことができる。

業業および本程等の方法に用いるれ場る事件業的抗体の複製の例を下記に総数 するが、これらは単に何承のためのものにすぎない。

ターガタクトンダーがは光分に潜途付けられており、そしてその倍益は容易に 検定され寄る。

ダルコースオキンダーゼはアスパラギルス・エデル(forestillus elect)から実施に分離され、1.8.6 k Dの分子量と有する。グルコースオキシゲーゼはマンノースを裏面に含む物理自であるので、計算過去率にしたネマンノースの対置過去和いて交叉反応させ、減合不満に誘動の駆射機能と相加させることができる「Roselie B. S. M. (1987) Appl Biochan Biotechnol 近、200 J、グルコースオキングーゼチ美体のサイスは化学度形により強重することができる。グルコースオキングーゼは、放棄電便の確認成力として地頂され得る。

クサナタマメから安切に分離され得るウレアーゼロ、分子重590と10の6 異 版 (hozorerie) 昼白であり、96kDのサブユニット名々に1つの話注點値を 優えている。ウレアーゼは無端電路における跡帯成分として依断される。

股份股本素体構能。29×Dの比較的低い分子量を有する単量体が無である。 原健原水級群系は二酸化成都の水利出土が規模水器隔からの競水を推転し、そしても下面はから変換は分離され待ち。

ホースタディッシュベルオキシダーゼは充分に特性作けられたヘム部のと言する { to har th et el el (1980) } Biol Chen (20, 0868)。ホースラディッシュベルオキンダーゼは、グルコースオキシダーゼにより依頼されてホースラディッシュベルカロンダーゼの数理として浮勝する連絡化水熱による勝葉カスケードを生じさせるために、グルコースオポシダーゼを第一部位に、かつボースラディッシュ

ベルオキングーゼを第二額値に関えた。2つの部位による先産銃矩方法(two sits impunoactay tolked)に関いることができる。

以下に、木先明による抗体の顕微およびそれらの世界方法を、単なる国系である間1~9を用いて規明する。まず、固固を簡単に説明する。

匿主は、本然明による近休の過ぎを説明している。

図2は、本発明による技術の用語を説明している。

総3は、本発明による前体から放出された酵素の補板を説明しているグラフである。

図4は、体発明による域はから故出された酵菜の簡潔を展明しているグランである。

図5は、本発明による気性から数出された酵類の溶理を説明しているグラフである。

図1に示される免疫グロブリンの数の2結構的抗療は、第1の模項16だよび 第2の構取18との遺産にそれぞれ用いる新一盟合類並12と新二結新部立14 とを含む、新1の状原16の第一前の結合前面12への結合は、結合していた第 2の状度の単二結合類位14からの故治を別8項です。

近側から第一緒会部後22への分前報2をの総合は、前記分列報26の不在を 来す難禁28の必能が容易に携出され待る媒体中への、場合していた降茶28の ではなる25円で

図2 11)で簡明される治療用地において、2件異的媒体30は、単純機の共産上の技術36対よび消費限制38はそれぞれ方向付けられた第一分よび消費限制38はそれぞれ方向付けられた第一分よび禁工結合第位32、34を有している。前記限附38は、第二結合部位34で信止に結合しているとき信は不活性化学れている。前記収収36の第一結合認位32への結合は、戊戌36を発現する福祉地に対して作用し得る溶性を解数での許る取れ

メトトレキセートを、抗原(研究)提及の群の発放単位を対断させるためには 由アルブミンと連結する。免疫化のために、充法の発頭で、あるいは定役無能を 強化するためにキーボールリンペットへモシアニンとの複合体として、軽空を使 用する。

免疫した日人に日イにマウスの直接反応を<table-cell>協し、そして適切な反応の世代に おいて免疫でカス由来の前談権限をマウスのSP2/G号盤議総能に場起数化することにより、ハイブリドーマをJ製する。まず最初に、ハイブリドーマを、最 的技事またはメトトレギセート核合体に受して、産薬結合免疫吸離液定生(EL 15人)によりスクリーニングする。次に、酵素に対する試体を分泌するクローン化ハイブリドーマにより改生されるエノクローナル放此を、耐熱中介器質定成 環底をプロックする能力でユクリーニングする。そのよりな反応をプロックする 成力を有するセノクロールが体は、転換の液性率 むまたはその近接で調金する ことによりそのように而くものと考えられる。メトトレモルート反応性抗体と、 メトトレモセートの無限を性効果をプロックする能力でスクリーニングする。

次に、適切なモノクローナル抗体を重要するバイブリドーマモ単位培用やて特 減して、ヒューゾーマ生理に適した済刑群性クローンを分離する。

ヒューゲーマ生産に適の改業利用性クローンと開発するために、2つの基状可能なマーカーを採用する。5 ms/nl のもーラボタアニンの存在下にハイブリドーマを活躍し、ビボモサンチンーグアニンーホスホリボンルとランスフェラーゼ 欠損受損を選択する。

テオグアニン関係を信仰するために、4×10°個のハイフリドーマ河包を 6×48ウエルが組織投資用信義販売に分けて深いたが、これらのウエル内には 30% (v/v) 熱不溶性をウンBF在達(FCS)を含むアルファ所自然性態 [Stanners CP, Eficeri C and Greek # 1977, Azture, New Biol 202, 523, Jフライマクロフィージ部図系からの20% (v/v) 漢建培施 [Camoon Xesserch 307 32, 546]、および5 astate の6・オッグアニン (Signa 4600) か合まれていた。任理3週間後、京都創作フローンのクローン外段が研究された。 タローンモビベッティングによりウエルから取り出し、そして試代確定した。如 水の分泌を改認し、設定性素質を解験した。次にこれらの支援を、機能料入工能 板ンステム [Linciefialm ] 2, (1966) Science 1点, 798] により基本する。 98の故事を引き起こす。

図を iii) に乗される政策および治療を組み合わせた用途においては、2つの 異常も2時間的性体40、42が使用される。飲食40は無規限に超せれる状態 443よび不器性な影響で報告する際数46に対する特異性を有している。気料 42は、抗病薬剤46なみびに酵素46立たは勧禁薬の反応処理に対する特異 性を育している。前肥気限44の就体40への結合は、特性な影響での新型能素 46の近世を引き起こす。この設定された服果の遺憾は容易は特生される。次 に、新記解解46年の反正生産地の1つが第二の依然42に結合し、それ により異例48の放出が引き越よされて試算44を発表する透明的を終す。

2 特別的抗体はハイブリドーで認用数合核境により簡単に振製することができる。 例如に、表切をモノクローナル配体を分泌するハイブリドーで知知が分離をれ、そして特性付付られる。次に、現場販売が様々の岩損特地における生長による消耗財性を発現させられる。これらの販売的性クローンは、次にで、異なら面側がはの機和関係の原の、あるいは実利財性ハイブリドーでを免疫でする患事の定額制能との個の細胞配合によると特別的拡充生産に接限される。 利認和をおよび最快の住。 経費性は解解の反応性を有する対体生産のためにスクリーニングをれる。 母親された経業物はクローン化され、そして反应検定により、このとューゲーブによる2特異的免疫グロブリンの分部が確認される。

本発明の依用において、分後される気軽グロブリンは最白ステフィニティクロ マトグラフィーにより超錯される。次いで、環路された例外がシーケンシャルア フィニティスロコングラフィー工程に掛けられて、均衡な 2 特別的意味グロブリンが分配される。

## 2 特別的抗性の頻繁

## A: 変切なモノクローナル社体を分泌するハイフリドーマの頻製

2 推集的技術はヒェーソーで設的により選用に顕親される。

単句に、モノタローナル技術を分泌する問題系を、300個群策等よび軽視器性 窓列メトトレキセートに対して分離する。

海病剤性組織もまた、哺乳動物剤能硬のナトリウム-カリウム ATPアーゼを 経営する熱心気機能であるウアバイン(outbrie)の調焼を増加させた特単にお 付る経過により延少する。ウアバインの管理下では野生菌建物は死亡するが、同 性クローンは150ボルド([old)を超える再測過無中で重異することができる [Hankovita K at at [1924)Cold 2、221]。

ウアバイン財役を特殊するために、2×10<sup>1</sup>協のハイブリドーマを増散し、 そしてアルファはも近、10度(ッ/v)ドウラを含む1×制から0.5m所まで 増加させた機能のウアバイン(Signa 03128)を含むせた増進で遊れブリドーマ を提供機能した。

2 異菌羽(関わウアバインおよびチャグアニン)配金と33年するために、上近 と対理に地頭をせた速度のウナバイン中で細胞を生発させた。 0.5 mm ウアバ イン地域中での生気が可能となった細胞に、上限と同様にして6 ーテオグアニン に対する契約関係と誘導した。

6-チャグアニンおよびウアパインに対する製性を存するハイブリドーマき、 ヒューゲーフの患者のためにクローニングした。

## 6) ヒューゾーマの生産

一連の細胞投資機能における作用機能能により、2 始異的抗体を分泌するヒューソーマを単極し、熱性反応性結合等(enzyne-reactive tra)および目的知识原
を認識する第二抗体結合前位主義之名 2 特殊的成体を企産するヒューザーでを選 状する。ヒューザーマを、気短マウスの保障結構立たはハイブリドーマである。 株主度に供納限す。および"特点原原性経験"から特殊する。抗原反応性経過が 誘致、4 3 k D の前白アルブミンを認識する抗体 A 1 5、8 O D k D のデーキールリンペットへモシアニンを経験する抗体 B も 1、次らびに関方技にした単共 直送性物質で、第20 A (S P・A)と反応する抗体 D 4 がよびと3 [Rendie 8] 社 社 社 (1992) 準備中)を生態する制度を包含している。抗体 D 4 がよりまり の結束 (Baroki \*\* 社 4 A - J 2 thei 1916 129: 29-33)に対象された抗体 P E 1 O に規則しているものとおとられている。下記に来する自の実数により前此 除金の数を実践する。 歌一般: 効果反応性まれは軽素反応性でありナカイアニンに耐速な引入する 気性ハイブリドーマと、酵素反応性まれは減減反応性の免疫でウスの健療場形と の時令。および軽熱合調製の光入下療法。

新二娘: 杭原反応性また法療素反応性のどちらか一方であるテオグアニン司性ハイアリドーマと、はハイブリトーマが試底反応性であるとされば解素反応性でありその他の場合には旋爆反応性であるウアバイン再性ハイブリドーマとの離合。および該難合類態のウアバイン・テオグアニン坊地による直接。

業差類: が原何応他または酵素反応性のどちらか一方であるチオグアニン/ ウアバイン2番目性ハイブリドーマと、扱ハイブリドーマが法歴更応性であると をはは酵素反応性でありその他の場合には抗歴反応性である野生型ハイブリドー マとの融合および製剤を抽動の呼んす。サアバイン指域中での基本。

・単規限合は原準的を接続により調節する。チボグアジン関係ハイブリド…でを 免認マウス由来轉弾把他とそれぞれ1:20の細胞化前で混合し(第一個)、そして で血清光会布治性中で50%(一/マ)ボリエチレングリコールと500分符を 下に75時間インチェペートすることによりヒューゾーマを調整する。和加数4 等と、単独合有生質増配の一定時間後の米前により終了等せる。次に、ヒューゾーマネマルナウエル均乗後内に800以上の前4の接触として相よ、そして2 透慮に辺って付入下型数的幾中で均減する。

舞なる最終可能なマーカーを強える2種類の手が本定するハイブリビーマの配合によりとユーザーでを選するとき(第二組)には、熱会に先立ち 1:1.5元 単で右側理士を組合する。最合革命は直積まる有法地やできり近いパッ)ボリエーチレングリコール 1 き00 の存在すにする行標実践する。この反応は、一造の運業できる確認かたる直接合有特性の強加により持てきる。持られたヒューゲーマは、アルチウエル海疾状ので200の別々の当然として、5 にか3 チオグアジンと 0.5 mK カアバインを含有する基数性組令に埋える。37でにて5%(マ/マ1 CO)空気中で2週隔インギュペートした際に、情質を顕微する。

ク報知別献性ハイブリドーマと野忠俊ハイブリドーマとの融合によりじューゲーマを坐座するとさ(第三頭)には、融合に完立わり、1の生海で知能両立を異合する。発合等点は、正領東古野等総甲でもなり、リノントポリエチレングリコール1500の存在では75秒高級誌する。この反応は、一定連定で5分隔にも

総紀様合株は飲水を迎定するために2つの概なる万造で依陽する。第一個日の 方法では、然底を19分間がけて添加し、その主催みを取り出し、そして次によ の上程みを執定してお記載合体から放送される除雲流性の存在を認べる。第二項 目の万様では、同時に行われる2工程方式において、解禁運算を気限と同時に終 紀核合体に動物する。同方の場合に行いて、試験中の収収の存在を量す必算試験 に伴う色の製食により、種類指性を直接的に割定する。

形えば、密鉄依洋達の分割により装製された砂表面合性物質アボ管白み( Katyal St and Siggs 6 (ER/9) Lab Invest 22 5923 を用いて、後定の物量接を 引く、モレて、未熟分送から併た年水試布のアボ股白紙関を物定する。

## 按你站在是另際實際人士明治士多之時異的抗後

ヒューソーマの既認所の人しまり、19年、8で-Aも(大部画:Encharishia 1941 由来の1月・ガラフトシダーゼとに反応する2付達約免税グロブリンを免決 する。この相観系は、5・テオブアニン原達ロ4ハイブリドーマ(Randte 虹 蛙 1992 準保中)のサブタローンであり8P・Aと表現する技体を介格するD4 t ま 13と、ミョウバンアジェバントに担切された投資差型のりも日本をの8-ガラ クトンダーゼ(Sizes 5553)でお設備に及り第1級免疫を乱た男人し日とマウ ス合来の自採物配との需要要を多から分析された保証である。結節社会民職 に発立って20×8の8-ガラクトンダーゼを利益マワスの解析のに4日間今之

知道社会は様類的な技術により実施し、そして終られた細胞辺合理を出れて並 被境地中に確えた。無蔑物を17日はにスプリーニングした。できるめたユーゲ 一マ格美が得られ、その内の41がターガラクトシダーゼと及のする依依を分符 することが簡単E15号により影響した。ウエスターン発達プロットにより選 並したところ、8分質部が5P-Aとないガラクトシダーゼの取方と反応する疾 グロブリンを分添した。これらの場盤物を、限度の動態によりクローンでし、そし できるなる研究のために6クローンの塩質を送破した。これらめらクローンの個 配売の1つがほみ130、19である。6人に30、19の試験はダブベスト条約 の契約点項に能し、より92年4月22日付けで実化等号:8344211として成祖 たる重視を寄格地の活動により終了させる。ヒューゾーマは、マルチウエル母奏 配内さ200の割りの培養として、0.5m以 ウアパインを含有するHAT庭録 密館中に握える。

次の治療物を前距離業またはメトトレキセートの認識でスクリーニングする。 そして、双名性格曼斯を監視された抗原の認識に関して試験する。増養物を、静 素出合免疫吸動検疫法(80188)により、選択された抗原と反応する抗体の 分泌でスクリーニングする。ウエル翼たガラO×1のO.まび 英粒撮影談(p.f. 9.8) 中に対いてもにで一切インキュペートすることにより、ラー10 19/1 の漢皮で96-ウエル液葉板上に抗原と不動化する。10%(٧/٧)ウシ胎牙血 清を古むリン酸球衛会温水(Pas)をウエル当たりも00x|卵って、玄塩で 2時間に思って治療液をブロックした。試験される過度主選みを、ウエル値だり ラG # 1 で重複して試験に供し、そして認識で 1 時間インキュペートする。この 強製液を0.05%(v/v)サイーン20を含むPBSで液疹し、次いで、第二 層牌様に結合した抗マウス角接グロブリン抗体を用いて、酵素鑑賞変情の連続的 な映出はより始合原外を供出する。欲いで、ご符異的技術を分泌すると所属され た培養物を限定性抗力よび単細筋単位の基準的な技術によりクローン化して、ミ リグラム単位の量の分泌免疫グロブリンを全頭するために移動する。そして分泌 された労働を、イオン交換クロマトグラフィーにより特性付けし [Kons JT And Coluin 89 (1987) J. Innertol. 130 (1987) 、関陳的全計版に無用する穴のに舞 **錠する。本実施供はおいては、免疫グロブリンの精製のためにアフィユティクロ** マトグラフィーを用いた。

#### 接定の圧落

ヒューブーマにより分泌される2特別的発症グロブリンまなは遺瘍発度グロブリンを、見し1 8人に一子イング環境深中でインベニトしてマルチウエル指数液上に不動化する。地差板は、10% ( v/v ) まならを含むPBSでブロックでも、次に、前起新年を構成会市場通中でインキュベートすることにより発表をあるでする。 未お会談案に依存なより保禁し、そして新年経費を依付性労働的がある。

柳朝樹脂酸幾コレクション {tibe European Collection of Animal Coll Custure, Portoe Down Whited Kingdom | な客局されている。

この相胞系は、アルファリス下物液中で慎厚の方流にて触葉され、選擇しない 単構造業症乳染存に対いて、1m 1当なり程度5 μ g の先級グロブリンを止患する。

議領G人と30.19免疫グロブリンを敬助人セファロース (Sizea PSSE1) を用いた関準的ウアフィニティクロマトグラフィー投資により分離した。 電源に開始を記述、情襲制を設み 1.21を1所トリス塩酸(PHS.5)の流がによりHS.2に調整し、そしてりm1の更知人セファロースカラムに減した。 1 Mトリス塩酸(PHS.5)の流がにてりHS.2に調整したPBをで10国流浮した後、0.1M クエン酸テトリウム製造後(PHS.5)を用いては合発症がただ。0.1M クエン酸テトリウム製造後(PHS.5)を用いては合発症が立プリンを部成した。1 m ! #の面分を1 M トリス塩酸(PHS.5)700 ロードよう気をに中間した。1 m ! #の面分を1 M トリス塩酸(PHS.5)700 ロービよう気をに中間した。2の溶構面分の低合機でしてコーブルー(Cosatic Blaz)を関係合定度により関交し、かつ間がELIS人により促進が固定がほじた。移動場的1.2!から6.05m目の免疫グロブリンが分解された。最近、建物された。6元のの保存と13人による気能力に関するの。

## g-ガラクトングーに知まび5.P-A度方の経搬を関示する館店議選

連続G ALSO.19を技術構造EL!SA方式に用いて、8・ガラクトシグーゼがよびSP-Aを検出することができる。構造に説明すれば、炭酸水熱塩板面経くPR9.61をサエル当たり50ヶ1用い、減速1m1当たり5ヶヶで、免疫グロブリンを4℃にて一晩インキュペートして96・サエル平低免費を設備表現 (Falson Cat Ro. 3912) にコーティングした。10%(マノマ)をごSを含むPBのまたアル底に510回×1間い、物養減を至緩で2時間プロックした。

## a・ガラクトシゲーで統原領策:

#### 初表平6-506827(罗)

OからLOC un/v) の増加した速度の3-ガラクトシゲーゼを30点!容積づつ研究に変し、発露にてし物限インキュパートした。 0.5%(ロ/マ)ツイーン20を余むPRS 200点|を探けてカエルを2回機分し、そして結合カーガラクトシゲーゼを解釈誘義である。3-ガラクトシゲーゼを関連領で、の低級により放送した。この高度端接は、適味かに加配しながら0.1%リン酸揺棄を1円・3)1m3に溶解したローニトロフェニル 3-Dーガラクトピラノシド(figua H-1127:CNPG)20.5m3を含む、ONPG溶液 332µiをリン酸緩緩緩 5m1に溶掛したが、この接種液径、ワシ血液アルブミン(しゅコ)と現化でダネシウムを下端の飛台。

2.7m1 0.1M 5 HT 5 リン酸酸糖液:

6.5% (m/v) bsまを含む0.1ml 0.03M 信仰でグルレウム、 で含有していた。技能構設方式において、G人しまり、19は、最小限1ml当 たり5よものまっガラフトンダーでを検出した。

#### SP-A按原類提:

5~100 mt/el の減疾の分と・人を50以上でつ供し、空流で1時間インがよべーとした。ウエルモツイーン20を含むPB3で2回流身し、そして知合した SP・Aと、PBS中の1、30 至らビオチンのウエル番たり30以上の抵抗により強出した。EBハイブリネーマは、DAと舞立り、SP・Aの那二工ビと一 アと反応するモメクローヤル採取を分法する「Annoise et al 1992 伊城中1。至 島庭夜グロブリンは、東位グロブリン最たり程度3ピオチン分子の報合で直接を れる(野桜E8-ピオチンは1m1当たり1mをに情報とれていた)。30分間 のインキュペーションの後、毎至低モツイーン20を含むPBSで20気がし、そして次にウエルモリで50分割、PBS中の1:900アビジン・アルカリ お名け居に51mm は3575。ウエルモンイーン20を含むPBSで3節洗浄し、そして次にアルカリオスフォターゼの応収を、二翼変換、前ちパターニトロフィエル ホスフェートの六水和箱・ニナトリウム(Signo iQe-(iDE) への変換により検出した。除線に説明でれば、ウエル当なり50以上の変換により検出した。除線に説明でれば、ウエル当なり50以上の変換により検出した。除線に説明でれば、ウエル当なり50以上の蒸食、即ち "アルカリ

もりックスが保持しているクロマトグラフィーゲルを用いた第二のプフィニティクロマトグラフィー工稿に使した。DE人産業を実績し、均質な2投資的拡注と展視し、そして0.02%アジドと含むPBS中に、復済助まで4では工作業した。プロマトグラフィーの完了時には、減燃免疫グロブリン 0 3Bm 8が終られた、表も混られた海分の統体力延はカーボラクトンダーゼに対しては1:10%、SP-人に対しては1:10であった。みし、50・19の形質的上がし続の存在は、対記均質な監督の選先条件下における10%(W/v)SDS PACE電気は動強により確認した。

## 在该件介信号形象牌人の明示

勿實導人収益管的は、延高人アフィニティクロマトグラフィーにより対策された誘拐に入しる0.19免疫グロブリンと、5P・人セファロース的よびβ・ガラフトンダーゼセファロースによるシーケンシャルアフィエチィクロマトグラフィーにより高格位化から均質化して分報した短製皮袋グロブリンとの数分により明示された。

## 後端前1、濃端免疫グロブリン療性(図3分割)

でしまられコーティング器審定である状態が常販機両(\* H 9. 5.) をウエル 別たり50m1 層い、混雑した1当たり50ヵまで、結構のAし310.19免 破グロブリンを4でにて一晩インキュペートして写得表面をコーティングした。 10名(\* V / v) ドロらをきむPBSをウエル当たり100m1 川口で、 は果板 を選慮で2新限プロックした、次に、 ウエルモ、G.5% (\* V / v) のりまる(\* Sitox A7580) 2まむPBSが外援機関で110 日のウ20mをの4-ガラグトレダーできまで紙 50m1とを返で10個インキュペートした。次いで、ウエルモ 0.05を(\* V / v) ンイーン20と含むチRS200m1で2個洗汗し、不動 化した光度収入洗涤状を徐から系統合数字を取り高いた。

次に、条件機関派で特別した。6.25~100 収/M の増加した落度の、特 異的技式SP-4、分子属800kD (グルトン) の非特異的新原ドレジ、およ ポスファター性基質<sup>\*</sup>を1対 ジエタノールアミン減強道(pH9.8) 1m | 質 た91mまで増加した。アルカリポスファターゼ海製運運搬送、ジエタノールア ミン 97m1、水 860ml、単化マグネシウム大水和額 500mまからな 810(マ/マ)ジエタノールアミン退棄理な金人でいた。1以 豊数を超減の かけが9.8となるまで活動し、次に水を動動してその体積を1リットルとした。 使用するまで40の環時により接近した。 舞業による経典運搬は、430mmにお 付る光が選集の調度により接近した。この処果種裏方式を用いたと単に、GAし 30.39気を発行ら、25 mc/mlのSP-Aを集立することができた。

#### GAL3G.19によるよ-ガラクトシダーゼ活性のブロック

□ so/of の機能は人に20.19免疫グロブリン 50点!をお・ガラクトング …ぜの88名標報 50点!に添加して500 so/of の概葉とした。これにタ・ ガラクトシグーゼ議署 100点[を認加して410 nmに対ける数学速度で差 質変換を監視した。 3分開法、試験は料中の酵彙主収物の光等濃度は、反体の不存 在下では0.930、そしては人に30.19の存在下では0.59でであった。 このことは、6人に30.19がオーガラクトングーゼの健素活化をプロックする ことを関かしている。

## **向製化のための2台製的GAL30.19角標グロブリンの物料**

物質を2時異的変統がロブリンを、シーケンシャルアフェニディグロマトグラフィーにより誘端依体から分裂した。遠域方像はジーケンシャルアフィニディグロマトグラフィーであった。第一位異似位を展布する免疫グロブリンを、特難をロースを限するビードマトリックスを買いたアブィニディクロマトグラフィーにより分裂した。溶液は関本的な1 M ジエナルアシン(pR11) を用いてがい、そして適分は1 H トリス位置(pH3) にて中間した。中却した関分をG25セファデックス(応限)が適を戻いてどら5に技術液及列して"限程"した。この以降音次に、カバチラクトシグーゼを限済するビードでトリックスをダルマ

が歩子量100分kDの特許契約抗原!g外であるでウス急変グロブリンルと、 50点 | 事量づつ直接してウエルに供した。15分間操作その上海みを取り出し て、8-ガラフトングーで降資調性により、役合性からの酵素の基因を評価した。 試得50点 | 部置セピーガラクトングーで爆撃振動を 50m1とインキュペート した。直覚から生成物への原製技、解記上度み中に放出された膵臓の存在で示す。 410mmにおける光学機能により創定した。

形質再入設合性からの静窓の証出は、カーガラクトングービ蒸質流化。および 4100mにおける主流独定事態度の認道により、確定上径み中で選択された。 120m以外ルンの分子量を習するSP・みの存在でのみ酸型が返退され、 報以する分子量の抗菌であるたし所(800km)および!ま居(100km) の存在ででは降限は医出さなかった。この効果は確定することができ、そして 流速数のSP・人において起和効果が記算された。

この方式では、GALSO-19形質導入指数は、最小限5.25 ye/w/ のS P-A全検出する。

## 異誌附2、模擬2将異的免察グロブリン領定

投稿的就既の存在下に、健康の放出が明示された(関を参照)。

■1.15Aコーティング級関係である成能水構塩級機関(タ対す.6)をウエル当たり5日±1用(1、調整1m)当たり2日±4で、情製GAし3日、19免 数グロブリンを4でにて一場インギュペートして毎回製面自コーディングした。 切断板を、10以(マ/マ)FCらま含むPBBをカエル当たり10日±1間いて当項で2時間ブロックした。故に、フエルを、0.5%(マ/マ)ウシ血液でルプミン (Signa ATBBB)を含するPを3を洗浄緩震液1m1当たり2日よのカラブラクトンダーゼを含む性 5日±1と至温で1時間インキュペートした。そした、カロルをフィーン2日と含むPREで2日徒ラして、単語の提案を不動化した影響様人能体致合能から取り除いた。

次に、洗浄機構流)は1当たり6.25~100±8に発射した機能制御の将 発的抗原8P-みおよび5P・Aによく低心分子型の操作契的構成にし対で30だ 1容量がつ、最初してウエルに振した。15分類は、上端みが取り出して、タ\* ガラクトレダービ案質変更により収起核合性からの酵素放出を評価した。

局限に説明でれば、試料50ヵ1をおいだラクトングーで高度接触数 50ヵ1 とインキュベートした。高質から生成的人の更減は、排配上見み中の鮮素の存在を集ず、410mmにおける光学建成により限定した。形質線入後合体から課題が定分に改造されたのは、特異的抗算3P-人の存在すにおいてのみであり、よく数大分子差の抗原以し目の存在すでは充分に放出されなかった。

課議祭3. 程数2特異的免疫グロブリアを用いた1工程提出他介紹与炒黄準人検 双 (図5参2:)

形質導入記述機合性を前段の如く函数し、ツイーン20を含むPBSによる2 図の数字により始美報から乗組合カーダラクトシゲーゼを洗い洗した。次に、映 質的状型執道と窓内に行われる探索変点を、下記の通り明示した。

流行星前線1m1 当たり6.25~19G以8に特別した、増加した選集の特異的部域5P・Aおよび3P・Aなよくなた分子星の非性異的記域以上月至50以1 3屋づつ割裂し、8-ガラクトシグーゼ建実短常成 50以1 3星と謀会した。次いで、技原とおいガラクトシグーゼ選集の現合銀行 190以1を、不動化した物質集入技術協合を含むりまたに活動した。対型機合体からの8・ガラクトシグーゼの放正による微落活性を、旋算に作力された起底物形成により楽しる色の410mにおける光学速度により死定した。

生成和形成は、試料法加速性(0°) とそのより分類性(8°0°) に認定した。その双方の場合において、GAL3G.19により経過される情見的試象SP・Aの市市のみが、完分な主義物形成でもたらした。この信用は、GAL5G.19の発度な免疫プロブリンに対する接近核影が、不活性結合計画の差異異項が数な対性を・ガラクトングーでへの信号形質準人によると生態変更における財育故患をもたらしたことを明確に示している。

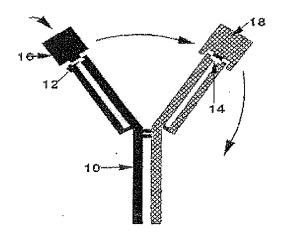
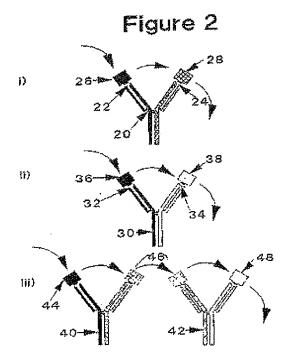


Figure 1



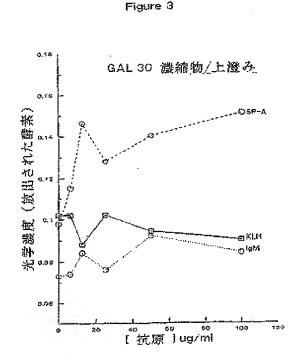
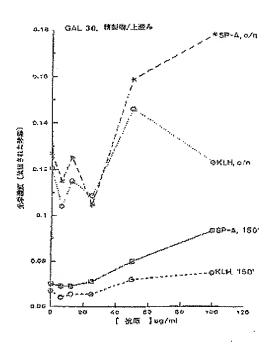
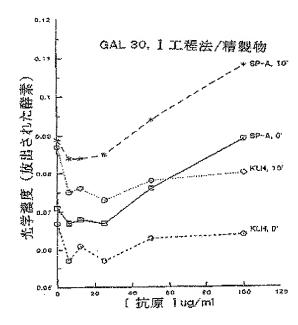


Figure 4

Figure 5





		取		331		em	PART VAILE	ne Ar	PCT/CS P\$/60TS
- (1,24   )))	JUAN OF HARRIST HAT	YF# 14	ind's	A- 574	***	H1 -JH			····
	CD3#35/201	A1	6 LOOK	7/15.  /44		ā	01931449 01513754		475/15/60 475/15/60
THEFT	F F F 7 3								
<del></del>			NE	WIE F			a W		
r, serveren	1000				9	49~	r topologic		
for Ct. 9	NCEG 5	:	×	dik ;		co	7E.		
		Liter Jan.	777h	th Lat		s britos. In plante	2 (1) (1) (1) (2) (1) (1) (1)	Mr. ip	
dr-Attuuumumum									
	or an amenda a manda de	1911.1.0	.,,					31	1 WHEN PURPOR
	Detail & Child Self.			- 1-1					
• [	WS, A.S. 303 67 Occober 1983 See the whole			(CH- 1	N'OO K	enit	661 a7		7-32
Ī	6 BR.A.2 109 615pd ia 13p	192	30	γ 15 Μ	55				
	ug, 6, 2, 0.07, 714 (and LEO) bisebuch systems and uppoint no. 12, may 1970 of each that Application see the whole december						1.32		
^ {	EP.A.D 362 91 see the whole				RS-T 19	P) Ł	Seril )	asp	-34
4	\$6_8,9 \$6\$ 31 \$ 38 April 35 \$60 the vhois	עפו		CASH		1450	575168.	LFQ.	1-34
1							_		
A december of the control of the con	AP AND BLOOD OF SPINAL	gi Ma pr Mil r spyr rje - grang gjr r pri <del>1970</del> rodo, st i -	art hart or four p or had hi	<u>.</u>				11-12 PM	of the Artist  of the
n ninger									
ERENOTAN	th ALCOST		- 40					1 9.	. es 22
FFFFFF	heofeans					-	COLFFE		Gered Hall

BBHLW	CAMPAGNET OF PROPERTY AND	
Manager J. s.	Course of Branch and September of Agency September of the	4
- 1	ŕ	1
`	CP_A,0 000 46) (E   OU PORT DE HERDAS AND COMMAN) 21 ORGANZAY 1903 See the Vinole decement	1-34
١	COURAGE OF EMPLOYMENT NATIONS	2-34
	W. B. M. of Lett Et Al.; "Production of hybrid half ideas based on Killet-repulsion couple stage in the emistigation	
š	see the whole dorwert	1
	PRICEPOINGS OF THE HATTOMAL ACADIMS OF SCIENTES OF USA NOT. 31. October 1986, MANIPATOM US PROSE 7889 - 7821.	1-54
	n S. SHRESH ET AL., "Adventages of bispecific hypotogoda in one-sate sebuscuptochemisery and feederactages" cited in the application	
	sek the whole decement	  -3¢
٠.٠	while 100 the coarson Duskicat Incultares, 130, ) of June 1991 glocy for the application see the mode whichted	1-54
١,	EP.A.O 829 EDA (HEORI MUNNIKATION) 23 August	
ı	v bu	}
	•	
- 1		1
- 1		1
-		
Į		
į		
- 1		
		1
		1
		1

痛 祭 蹲 拳 味 3

9.003744

#### **高原挥光观**:

This areas 1996 to a pear handle resident pilleding to be apoint dynaments white (i). Que up administrate interest homes trease, The conference on a monthesid him a translate frame Chief (C) for our The Comman System Chief is the contribution for the proceeding of the new parts of our translation of 1/08/02.

G8 9200749 SA 68784

## The same that the Prints Could be supported by the Arbeit Armanick wild at the Arbeit Armanic and the same transfer of the Armanic and Arm

PROMP RECORDER	Canal Services	to the second	PACIFI
NO-A-0301579	27-44-83	40-B- 556484 40-X- 1555963 CI-A- 1213424 ON-X- 627594 61-A- 0103569 63-A-8 2226031 63-A-8 2226031 63-A-8 2165084 13-A-8 2165084 13-A-8 226224	\$0-03-60 64-14-63 25-10-96 25-22-59 18-04-64 02-05-84 05-07-80 21-65-86 15-63-88
09-K-2]E992)	23-07-66	#81-0- \$50406 #81-3- 1555087 \$1-3- 1237229 \$1-4- 1237229 \$1-4- 123220 \$1-4- 232605 \$2-4.8 236674 \$2-4.8 236708 \$2-4.8 236708 \$2-4.8 326708 \$2-4.8 326708 \$2-4.8 326708	28-01-85 01-17-05 20-10-05 20-11-95 23-01-94 02-01-95 02-07-95 13-01-09 13-01-09 27-20-80
UG-A-SED7734	:2-07-90	66-4- 6142863 86-4- 4142863	03-04-93 09-34-93
\$\$-A-036 9∂8	61-04-93	4642043 -4-114 3011609 -4-114	38-96-90 05-36-99
EP-A-016371E	18-64-40	30-8- 3101275 MF-R- 8174758	10-04-91 05-84-90
EP-A-DOPF4 63	\$1-15- <del>0</del> 3	05-2- 444622 05-2- 4470695 02-2- 1194418 Jr-4- 84203215 05-4- 6470328	01-97-84 30-10-64 01-16-85 20-11-61 31-07-84
PD-3-9589134	73-01-91	None	
Eb-1-0559 FBY	23-85-87	Ø-4- 21(€99)	j2+Q5-9\$

Secure decimant Draft is broken injured	entancins Am		a pri d'arrête transferiel	Pythiopin Ame
-A-0329164		tij-A.	\$303951	21-64-98

## フロントページの統含

(51) fat. Cl. 5		識別記号		庁内整理番号	F	ĭ	
CI2M	1/34	Ę	2	7229 - 4 B			·
C12N	5/20						
	15/06						
GOIN	33/536	7		8310 - 2 J			
//(C12N	5/20						
CIZR	1:91)						

(81) 指定题 EP(AT. BE, CH. DE, DK. ES, FR, GB, GR. IT, LU, MC, N L. SE). OA(BF. BJ. CF. CG. CI. CM. GA. GN. ML. MR. SN. TD. TG). AT. AU. BB. BG, BR, CA, CH. CS. DE. DK. ES, FI. GB, HU. JP, KP, KR. LK. LU. MG, MN. MW. NL. NO. PL. RO, RU, SD. SE. US